

# 血红素肽铁的絮凝分离工艺优化及其抗氧化活性

刘晓妮<sup>1,2</sup>, 崔伟<sup>1,2</sup>, 张超<sup>1</sup>, 张永康<sup>1</sup>, 周辉<sup>1,2\*</sup>, 徐宝才<sup>1,2</sup>

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

**摘要:** 为实现血红素肽铁高效分离提取, 探究絮凝剂对血红素肽铁制备的影响。该研究以猪血为原料, 以血红素肽铁得率及纯度为指标, 筛选合适的絮凝剂, 采用单因素(絮凝剂添加量、絮凝 pH 值、絮凝温度、离心温度和离心时间)结合响应面法优化絮凝分离工艺, 并对其抗氧化活性进行表征。结果表明, 选用质量浓度为 1.5% 的壳聚糖溶液、添加量为 20%、絮凝 pH 5.60、絮凝温度 44 °C、离心转速 13 100 r/min、离心时间为 20 min 时, 血红素肽铁的得率和纯度较高, 分别为 68.07% 和 30.57%。在此工艺下, 血红素肽铁展现较强的抗氧化活性, 其 DPPH 自由基清除能力的 IC<sub>50</sub> 值为 1.17 mg/mL, ABTS<sup>+</sup> 自由基清除能力的 IC<sub>50</sub> 值为 1.25 mg/mL, 铁螯合能力的 IC<sub>50</sub> 值为 1.16 mg/mL。

**关键词:** 血红素肽铁; 絮凝剂; 分离提取; 抗氧化; 工艺优化

## Optimization of Flocculation Separation Process of Heme Peptide Iron and Its Antioxidant Activity

LIU Xiaoni<sup>1</sup>, CUI Wei<sup>1,2</sup>, ZHANG Chao<sup>1</sup>, ZHANG Yongkang<sup>1</sup>, ZHOU Hui<sup>1,2\*</sup>, XU Baocai<sup>1,2</sup>

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China; 2. Engineering Research Centre of Agricultural Biochemicals, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China)

**Abstract:** This study was performed to efficiently separate and extract heme peptide iron and explore the effects of flocculants on the preparation of heme peptide iron. The study used pig blood as the raw material and screened various types of flocculants based on the yield and purity of heme peptide iron. Single-factor experiments (including flocculant dosage, flocculation pH, flocculation temperature, centrifugation temperature, and centrifugation time) combined with response surface experiments were conducted to obtain the optimal flocculation separation process. The antioxidant activity of the obtained product was characterized. The results showed that using a 1.5% concentration chitosan solution with a dosage of 20%, flocculation pH of 5.60, flocculation temperature of 44 °C, centrifugation speed of 13 100 r/min, and centrifugation time of 20 min achieved the highest yield and purity of heme peptide iron, reaching 68.07% and 30.57%, respectively. Under this process, heme peptide iron exhibited strong antioxidant activity. Specifically, the IC<sub>50</sub> value for DPPH radical scavenging, ABTS<sup>+</sup> radical scavenging, and iron chelating abilities were 1.17, 1.25 mg/mL, and 1.16 mg/mL, respectively.

**Key words:** heme peptide iron; flocculant; separation and extraction; antioxidant; process optimization

引文格式:

刘晓妮, 崔伟, 张超, 等. 血红素肽铁的絮凝分离工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(3): 107-115.  
LIU Xiaoni, CUI Wei, ZHANG Chao, et al. Optimization of Flocculation Separation Process of Heme Peptide Iron and Its Antioxidant Activity[J]. Food Research and Development, 2025, 46(3): 107-115.

基金项目: 国家大学生创新创业训练计划项目(202210359075); 国家重点研发计划资助项目(2021YFD2100804)

作者简介: 刘晓妮(2002—), 女(汉), 本科, 研究方向: 副产物综合利用。

\*通信作者: 周辉(1972—), 男(汉), 研究员, 研究方向: 肉品加工与质量控制。

猪血中营养物质丰富,含有大量酶和小分子活性肽等功能活性物质,且必需氨基酸和维生素等总含量远超过人乳和全蛋,并且不会致敏<sup>[1]</sup>,是一种优质蛋白质来源,素有“液态肉”之称<sup>[2]</sup>。猪血在食品领域用途广泛,充当着色剂时,可以通过硝基化替代亚硝酸盐,被应用于腌肉、灌肠、香肠等,具有发色稳定、着色效果好的特点<sup>[3]</sup>。从猪血红蛋白中可分离得到血红素肽铁,可用于制作功能性食品,充当良好的补铁剂。相比于植物源铁而言,血红素肽铁作为动物源铁不刺激人体胃肠道,更易被肠细胞吸收<sup>[4]</sup>,生物利用率高,为25%~40%<sup>[5]</sup>。同时,血红素对机体内铁平衡代谢也有极其重要的作用<sup>[6]</sup>。

虽然血红素肽铁有较好的经济效益,但提取分离较为困难,目前普遍使用的方法为有机试剂提取法、酶解法<sup>[7]</sup>、絮凝剂提取法等。这些方法原理不同,各有优缺点:有机试剂(如冰醋酸<sup>[8]</sup>、丙酮<sup>[9]</sup>等)提取率较高但容易导致有机试剂残留;酶解法在提取过程中不涉及有毒有机试剂,成本低,对设备伤害也较低,具有较高的经济效益,适合工业化大批量生产;壳聚糖<sup>[10]</sup>、羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na)<sup>[11]</sup>等絮凝剂提取法操作方法简单,制造成本低,得到的产物品质稳定,但提取率和纯度较低<sup>[12]</sup>。因此本研究利用酶解法和絮凝剂提取法相结合,以猪血红蛋白酶解液为原料,利用絮凝剂对酶解液进行分离,提高血红素肽铁的得率和纯度,以期开发血红素肽铁高效分离方法提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与仪器

猪血红蛋白:合肥春然肉食品有限公司;碱性蛋白酶( $2 \times 10^5$  U/g):北京索莱宝生物科技有限公司;氢氧化钠、过硫酸钾、菲诺嗪、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)(均为分析纯):上海麦克林生化科技有限公司;海藻酸钠、CMC-Na、壳聚糖、 $\beta$ -环糊精、L-精氨酸、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]、氯化亚铁、吡啶(均为分析纯):上海阿拉丁生化科技有限公司;所有试剂均使用超纯水进行配制。

902GP 超低温冰箱:赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SCIENTZ-12N 真空冷冻干燥机:宁波新芝生物科技股份有限公司;WE-3 水浴恒温振荡器:天津欧诺仪器股份有限公司;LHH-2 恒温水浴锅:常州金坛良友仪器有限公司;FE28 型 pH 计:梅特勒-托利多科技(中国)有限公司;Synergy H1 多功能酶标仪:美国 Bio-Tek 仪器公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 猪血红蛋白酶解液的制备

以猪血红蛋白溶液为原料,加入 1.3 倍质量的水,

加入 0.3% 的 L-精氨酸保护剂,调节 pH 值至 10.0,避光反应 30 min。加酶量为 7 500 U/g,在 45 °C 下酶解 5 h 后,置于 85 °C 环境下灭酶 15 min,冰水快速冷却后得到酶解液。

#### 1.2.2 絮凝剂种类的筛选

以酶解液为原料,分别添加等体积的 1.5% 壳聚糖溶液、1.5% 海藻酸钠溶液、1.5%  $\beta$ -环糊精溶液和 1.5% CMC-Na 溶液 4 种絮凝剂,静置 20 min,调节 pH 值为 6,在 4 °C 下,10 000 r/min 离心 10 min。得到上清液和沉淀,测血红素肽铁的得率和纯度。

#### 1.2.3 絮凝剂分离血红素肽铁工艺的单因素试验

##### 1.2.3.1 絮凝剂添加量对血红素肽铁得率和纯度的影响

向酶解液中分别按照 5%、10%、15%、20%、25% 添加质量分数为 1.5% 壳聚糖溶液,静置 20 min,在 4 °C 下,10 000 r/min 离心 10 min。得到上清液和沉淀,测血红素肽铁的得率和纯度。

##### 1.2.3.2 絮凝 pH 值对血红素肽铁得率和纯度的影响

向酶解液中添加 15% 质量分数为 1.5% 壳聚糖溶液,使用 0.1 mol/L 盐酸溶液和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节絮凝 pH 值分别为 3、4、5、6、7,搅拌 10 min,静置 20 min,于 4 °C、10 000 r/min 条件下,离心 10 min。得到上清液和沉淀,测血红素肽铁的得率和纯度。

##### 1.2.3.3 絮凝温度对血红素肽铁得率和纯度的影响

取一定量酶解液,先分别在 30、35、40、45、50 °C 下恒温 10 min,添加 15% 质量分数为 1.5% 壳聚糖溶液,快速调 pH 值为 6,搅拌 10 min,恒温静置 20 min,于 4 °C、10 000 r/min 条件下,离心 10 min。得到上清液和沉淀,测血红素肽铁的得率和纯度。

##### 1.2.3.4 离心转速对血红素肽铁得率和纯度的影响

取一定量酶解液,40 °C 恒温 10 min,添加 15% 质量分数为 1.5% 壳聚糖溶液,快速调 pH 值为 6,恒温静置 20 min,调节转速分别为 5 000、7 500、10 000、12 500、15 000 r/min,离心 10 min。得到上清液和沉淀,测血红素肽铁的得率和纯度。

##### 1.2.3.5 离心时间对血红素肽铁得率和纯度的影响

取一定量酶解液,40 °C 恒温 10 min,添加 15% 质量分数为 1.5% 壳聚糖溶液,快速调 pH 值为 6,恒温静置 20 min,调节转速为 12 500 r/min,设置离心时间分别 5、10、15、20、25 min,得到上清液和沉淀,测血红素肽铁的得率和纯度。

#### 1.2.4 响应面法优化血红素肽铁分离工艺

以单因素试验的结果为基础,参考 Box-Behnken Design 试验构建思路,对絮凝 pH 值(A)、絮凝温度(B)、离心转速(C)3 个因素进行进一步优化,以血红素肽铁得率(Y)为响应值进行试验,优化血红素肽铁分离工艺条件,试验因素和水平设计见表 1。

表1 响应面试验设计因素与水平

Table 1 Response surface test design factors and levels

水平	因素		
	A 絮凝pH值	B 絮凝温度/°C	C 离心转速/(r/min)
-1	4	40	10 000
0	5	45	12 500
1	6	50	15 000

### 1.2.5 血红素肽铁得率的测定

血红素肽铁含量测定采用三波段检测方法并作适当修改<sup>[13]</sup>。分别取1 mL离心后的上清液和1 mL的酶解液,各稀释10倍后采用三波段检测方法,在525、545、565、575 nm测定吸光度,计算出各自的血红素肽铁含量及得率,计算公式如下。

$$C = (-0.166R_1 + 0.086R_2 + 0.088R_3 + 0.099) \times A_{525}$$

式中:  $C$  为血红素肽铁含量, mol/L;  $R_1 = A_{575}/A_{525}$ ;  $R_2 = A_{565}/A_{525}$ ;  $R_3 = A_{545}/A_{525}$ 。

$$Y = 100 - \frac{C_1 \times V_1}{C_2 \times V_2} \times 100$$

式中:  $Y$  为血红素肽铁得率, %;  $C_1$  为上清液中血红素肽铁的含量, mol/L;  $V_1$  为上清液体积, L;  $C_2$  为酶解液中血红素肽铁的含量, mol/L;  $V_2$  为酶解液体积, L。

### 1.2.6 血红素肽铁纯度的测定

标准曲线的绘制:参照庄红等<sup>[14]</sup>采用的吡啶-氢氧化钠显色法,用25%的氨水溶液配制系列标准溶液。将标准溶液和吡啶(30%)-氢氧化钠(0.1 mol/L)混合溶液(1:1,体积比)按体积比为1:4混合,混匀后迅速在557 nm下测定吸光度,用25%的氨水溶液作为空白对照,绘制血红素肽铁浓度-吸光度标准曲线。

样品的血红素肽铁含量测定:取1 g冻干后的沉淀制成5 mL的样品液,将样品液和吡啶(30%)-氢氧化钠(0.1 mol/L)混合溶液(1:1,体积比)按体积比为1:4混合,混匀后迅速在557 nm下测定吸光度,与标准曲线对比可得出样品中血红素肽铁的含量(mg/mL)。血红素肽铁纯度按下列公式计算。

$$Y = \frac{C \times V}{M} \times 100$$

式中:  $Y$  为血红素肽铁纯度, %;  $C$  为样品中血红素肽铁含量, mg/mL;  $V$  为样品溶液总体积, mL;  $M$  为样品总质量, mg。

### 1.2.7 血红素肽铁体外抗氧化活性测定

#### 1.2.7.1 DPPH 自由基清除能力测定

采用Li等<sup>[15]</sup>的测量方法并稍有改动,配制0.2 mmol/L DPPH(溶于95%乙醇)无水乙醇溶液,现配现用。量取1 mL样品溶液和同体积的DPPH溶液混匀后室温避光反应30 min,于波长517 nm处测定吸光度( $A_1$ )。用无水乙醇代替DPPH溶液作为对照组( $A_2$ ),用蒸馏水代替样品溶液作为空白组( $A_3$ )。DPPH

自由基清除率( $X$ , %)按下列公式计算。

$$X = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100$$

#### 1.2.7.2 还原能力的测定

量取1 mL样品溶液,添加1 mL 0.2 mol/L的磷酸缓冲液(pH6.6)和1 mL 1%的铁氰化钾溶液混匀,于50 °C水浴锅中恒温30 min,加入1 mL 10%的三氯乙酸溶液混匀,5 000 r/min离心10 min。取2 mL上清液加入2 mL蒸馏水稀释并加入0.4 mL 0.1%的氯化高铁溶液混匀,于室温反应10 min,在波长700 nm处测定吸光度。

#### 1.2.7.3 铁螯合力的测定

量取1 mL样品溶液,加入0.05 mL浓度为2 mmol/L的FeCl<sub>2</sub>溶液和0.2 mL浓度为5 mmol/L的非诺嗪溶液混匀,于室温下反应10 min,在波长562 nm处测定吸光度( $A_1$ ),用蒸馏水代替样品溶液作为空白组( $A_0$ )。铁螯合率( $Y$ , %)按下列公式计算。

$$Y = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

#### 1.2.7.4 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力的测定

分别配制4 g/L的ABTS原液和0.7 g/L的过硫酸钾溶液,将原液和过硫酸钾溶液按体积比1:1混合,置于常温下避光静置12 h后加入无水乙醇,稀释45倍左右,得到ABTS工作液。取1 mL工作液加入2 mL样品溶液,混匀后避光反应6 min,在波长734 nm处测定吸光度( $A_1$ ),用蒸馏水代替样品溶液作为空白组( $A_0$ )。ABTS<sup>+</sup>自由基清除率( $Z$ , %)按下列公式计算。

$$Z = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

## 1.3 数据处理

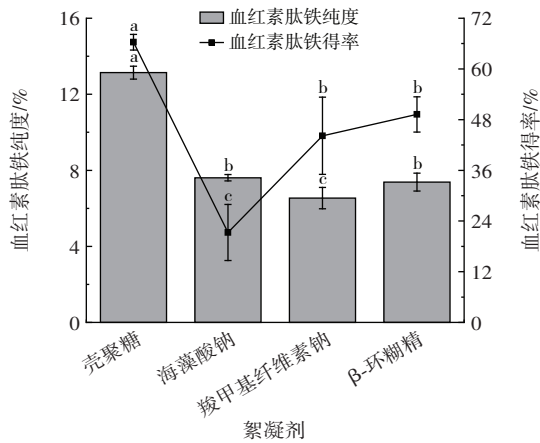
本研究中所有试验均重复3次,结果表示为平均值±标准差,采用Design Expert 13和Origin 2021对试验数据进行作图分析,使用IBM SPSS Statistics 22中的方差分析(analysis of variance, ANOVA)和Duncan多重检验( $P < 0.05$ )进行比较分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 絮凝剂种类的确定

絮凝的桥接机理依赖于絮凝剂同时吸附在几个细颗粒的表面。由于絮凝剂的分子量高,聚合物将细颗粒桥接成大的、快速沉降的絮凝体<sup>[16]</sup>,选取合适的絮凝剂是进行絮凝分离的关键。图1为不同絮凝剂对血红素肽铁分离效果的影响。

由图1可知,使用壳聚糖进行絮凝分离的效果最好,血红素肽铁的得率和纯度均最高,分别为(66.33±2.03)%、(13.14±0.34)%;海藻酸钠的分离效果最差,血红素肽铁的得率最低,为(21.29±0.22)%。可能原因为壳聚糖是天然多糖聚合物,分子量高,其分子中含有羟



同一指标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图1 絮凝剂种类对血红素肽铁分离效果的影响

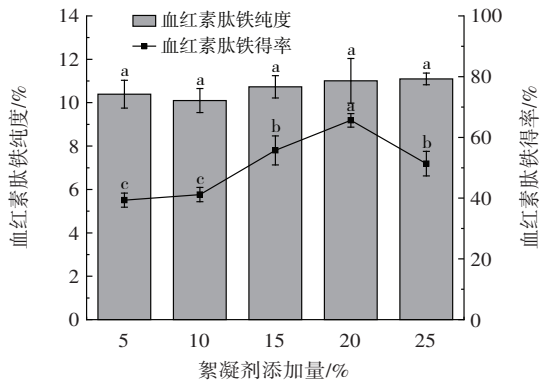
Fig.1 Effect of flocculant types on separation effect of heme peptide iron

基等极性官能团,这允许形成大量氢键,有助于壳聚糖的优异吸附性能<sup>[17]</sup>,血红素肽铁的等电点(isoelectric point, pI)约为6.8<sup>[18]</sup>,因此,在 $pI < 6.8$ 时,血红素肽铁携带净正电荷,而壳聚糖分子富含羟基、胺基、羰基等官能团,这些活性基团借助分子间作用力吸附血红素肽铁等大分子物质,形成吸附层,并通过架桥方式将多个微粒联在一起,同时壳聚糖分子可与铁离子螯合<sup>[19-20]</sup>,从而导致絮凝。因此,最佳絮凝剂种类为壳聚糖。

## 2.2 絮凝剂分离血红素肽铁工艺单因素试验

### 2.2.1 絮凝剂添加量对血红素肽铁得率和纯度的影响

探究絮凝剂添加量对血红素肽铁得率和纯度的影响,若絮凝剂添加量过少,胶体颗粒无法完全脱稳,这会导致分离效果不理想;而絮凝剂若添加过多,胶体颗粒出现饱和甚至超负荷现象,絮凝分离效果同样不理想<sup>[21]</sup>。图2为不同絮凝剂添加量对血红素肽铁得率和纯度的影响。



同一指标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

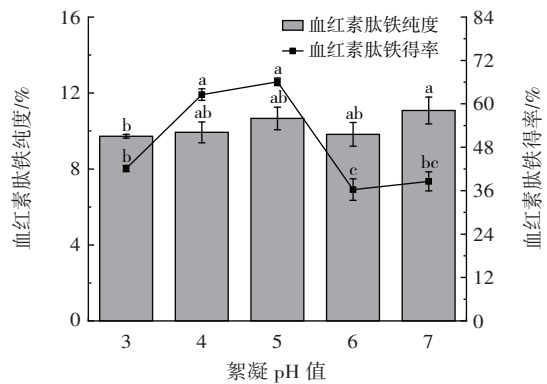
图2 絮凝剂添加量对血红素肽铁得率和纯度的影响

Fig.2 Effect of flocculant dosage on yield and purity of heme peptide iron

由图2可知,絮凝剂添加量为5%~25%时,血红素肽铁得率随着絮凝剂添加量的增加呈先升高后降低的趋势,这主要是因为溶液中含有较多血红素肽铁,絮凝剂添加较少时,絮凝剂过早饱和,因此,血红素肽铁的得率与添加量呈正相关;当絮凝剂添加量达到20%时,血红素肽铁的得率达到最大值( $65.61 \pm 1.26$ )%,此时纯度为( $11.06 \pm 1.86$ )%;絮凝剂添加量继续增加,血红素肽铁得率下降,纯度趋于稳定,这是因为絮凝剂添加过多,血红素肽铁胶体被絮凝剂包裹,电荷失衡,影响凝聚<sup>[22]</sup>。因此,选择最佳的絮凝剂添加量为20%。

### 2.2.2 絮凝 pH 值对血红素肽铁得率和纯度的影响

絮凝 pH 值对血红素肽铁得率和纯度的影响见图3。



同一指标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图3 絮凝 pH 值对血红素肽铁得率和纯度的影响

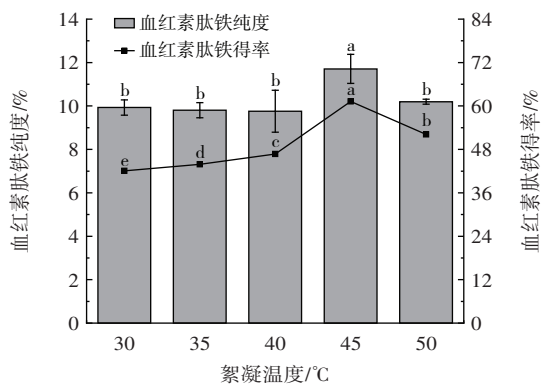
Fig.3 Effect of flocculation pH value on yield and purity of heme peptides iron

由图3可知,随着絮凝 pH 值增大,血红素肽铁得率整体呈先升高后降低趋势,当絮凝 pH 值为5时,血红素肽铁得率达到最大值( $66.09 \pm 1.02$ )%,此后血红素肽铁得率开始下降。当絮凝 pH 值为3~6时,血红素肽铁纯度随絮凝 pH 值增加而变化的效果不显著 ( $P > 0.05$ )。因为壳聚糖在酸性环境中带正电,这些离子可以通过吸附聚合物链来降低血红素肽铁电负性并促进沉降<sup>[23]</sup>,在碱性液体中,壳聚糖的胺基变得非电离或弱负性,从而降低了絮凝效率。根据 Zheng 等<sup>[24]</sup>的研究,壳聚糖的等电点为6.5,在温和的酸性条件下作为阳离子絮凝剂表现更好。因此,本研究选择壳聚糖分离血红素肽铁的絮凝 pH 值为4、5、6进行后续响应面试验。

### 2.2.3 絮凝温度对血红素肽铁得率和纯度的影响

絮凝温度对血红素肽铁得率和纯度的影响见图4。

每种絮凝剂有各自较为适宜的絮凝温度,由图4可知,血红素肽铁的得率和纯度均随着絮凝温度的升高呈现先增加后降低的趋势,当絮凝温度为45℃时达到最大值,分别为( $61.25 \pm 1.34$ )%和( $11.71 \pm 0.86$ )%。这是因为当絮凝温度较低时,酶解液的黏度较大,不利于絮体的形成<sup>[25]</sup>;随着絮凝温度的升高,溶液的分子热



同一指标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

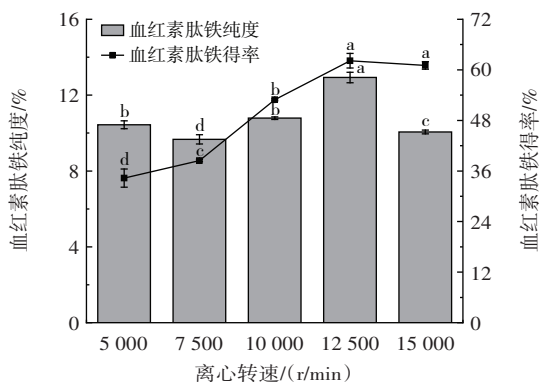
图4 絮凝温度对血红素肽铁得率和纯度的影响

Fig.4 Effect of flocculation temperature on yield and purity of heme peptide iron

运动加剧,加速了絮凝剂与血红素肽铁的结合,使其絮凝特性得以充分体现,利于絮凝分离的进行<sup>[26]</sup>;絮凝温度过高会破坏胶体结构,不利于分离的进行。因此,本研究选择絮凝温度为40、45、50℃进行后续响应面试验。

#### 2.2.4 离心转速对血红素肽铁得率和纯度的影响

离心转速对血红素肽铁得率和纯度的影响如图5所示。



同一指标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

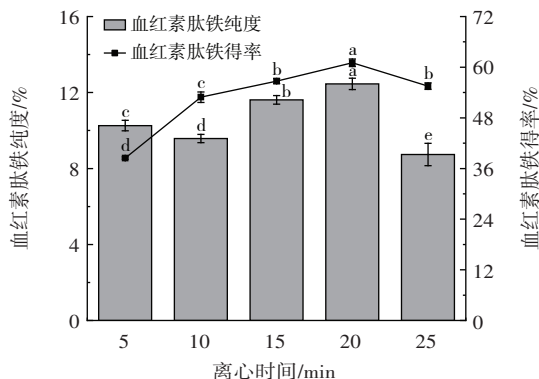
图5 离心转速对血红素肽铁得率和纯度的影响

Fig.5 Effect of centrifugal speed on yield and purity of heme peptide iron

由图5可知,离心转速为5 000~12 500 r/min时,血红素肽铁得率随着离心转速的增加而增加,当离心转速为12 500 r/min时,血红素肽铁得率达最大值,为(62.17±1.34)%,此时血红素肽铁纯度也达最大值,为(12.93±1.02)%。这是因为随着离心转速的增大,离心力增大,使得更多的血红素肽铁-壳聚糖絮凝物沉降下来,同时溶液中部分未与壳聚糖结合的血红素肽铁也被沉降分离;继续增大离心转速,血红素肽铁得率保持稳定,而纯度下降,可能是因为离心转速太大,使得酶解液中的其他杂质成分也被分离<sup>[27]</sup>。因此,本研究选择离心转速为10 000、12 500、15 000 r/min进行后续响应面试验。

#### 2.2.5 离心时间对血红素肽铁得率和纯度的影响

离心时间对血红素肽铁得率和纯度的影响如图6所示。



同一指标不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图6 离心时间对血红素肽铁得率和纯度的影响

Fig.6 Effect of centrifugation time on yield and purity of heme peptide iron

由图6可知,离心时间为5~20 min时,血红素肽铁得率随着离心时间的延长而增加,当离心时间为20 min时,得率达最大值,为(61.05±1.26)%,此时的血红素肽铁纯度也达最大值,为(12.45±0.97)%,当离心时间超过20 min后血红素肽铁纯度和得率均下降,其中纯度下降得较为明显。因此,本研究优选离心时间为20 min。

#### 2.3 絮凝剂分离血红素肽铁响应面试验

絮凝剂分离血红素肽铁响应面试验设计方案及结果如表2所示。

表2 Box-Behnken 试验设计与结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken experiment

试验号	A 絮凝 pH 值	B 絮凝温度	C 离心转速	Y 血红素肽铁得率/%
1	0	0	0	69.30
2	0	0	0	67.41
3	1	0	1	66.78
4	0	0	0	67.20
5	-1	1	0	57.96
6	1	0	-1	53.13
7	0	0	0	68.25
8	0	1	1	55.65
9	0	1	-1	52.71
10	0	-1	1	58.80
11	0	0	0	67.41
12	-1	0	-1	53.13
13	-1	-1	0	54.39
14	0	-1	-1	47.46
15	1	-1	0	62.58
16	-1	0	1	54.39
17	1	1	0	61.74

#### 2.3.1 血红素肽铁的分选得率回归模型的建立与方差分析

利用软件 Design Expert 13 对试验结果进行方差

分析,结果如表3所示。

表3 方差分析及变异系数

Table 3 Analysis of variance and coefficients of variation

来源模型	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	760.77	9	84.53	186.48	<0.000 1**
A 絮凝 pH 值	74.18	1	74.18	163.64	<0.000 1**
B 絮凝温度	2.92	1	2.92	6.43	0.038 9*
C 离心转速	106.51	1	106.51	234.97	<0.000 1**
AB	4.86	1	4.86	10.73	0.013 6*
AC	38.38	1	38.38	84.67	<0.000 1**
BC	17.64	1	17.64	38.92	0.000 4**
A <sup>2</sup>	32.35	1	32.35	71.38	<0.000 1**
B <sup>2</sup>	150.29	1	150.29	331.56	<0.000 1**
C <sup>2</sup>	288.98	1	288.98	637.53	<0.000 1**
残差	3.17	7	0.453 3		
失拟差	0.121 3	3	0.040 4	0.053 0	0.981 7
纯误差	3.05	4	0.762 9		
所有项	763.95	16	84.53		

注:\*表示影响显著( $P<0.05$ );\*\*表示影响极显著( $P<0.01$ )。

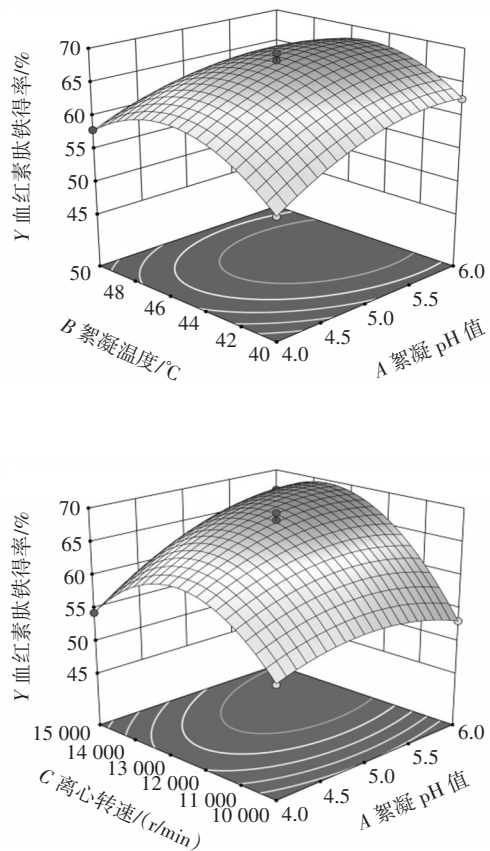
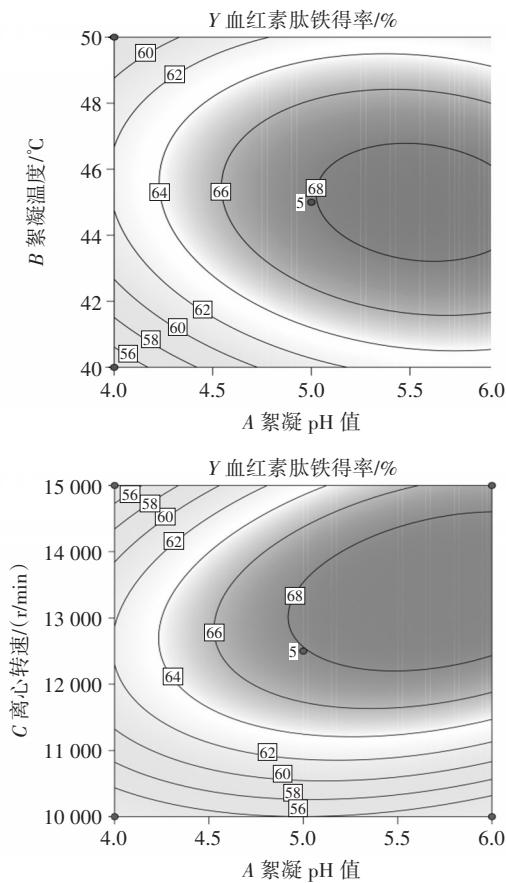
将数据进行多元回归拟合,得到的回归方程为  $Y=67.91+3.05A+0.6038B+3.65C-1.1AB+3.1AC-2.1BC-2.77A^2-5.97B^2-8.28C^2$ ,并对拟合回归方程进行方差分析和显著性检验。由表3可知,该模型的  $P$  值  $<0.000 1$ ,表明该模型拟合效果极显著,失拟项  $P=0.981 7>0.05$ ,

即失拟不显著,且模型决定系数  $R^2=0.991 2$ ,校正相关系数  $R^2_{Adj}=0.990 5$ ,拟合效果好,能够很好地反映出血红素肽铁的分离得率与絮凝 pH 值、絮凝温度、离心转速 3 个因素的关系。各因素对响应值影响的主次顺序由表3中  $F$  值决定,各因素对血红素肽铁得率的影响程度:离心转速>絮凝 pH 值>絮凝温度,其中离心转速和絮凝 pH 值对血红素肽铁的分离得率影响极显著( $P<0.01$ ),絮凝温度对血红素肽铁的分离得率影响显著( $P<0.05$ )。

### 2.3.2 各因素交互作用分析

在模型分析的基础上,进一步分析了絮凝剂分离血红素肽铁工艺中各个因素的交互效果。各试验因素交互作用的响应面和等高线如图7所示。

由图7可知,模型中交互因素的响应曲面开口全部向下,曲面中央隆起,四周凹陷,这说明曲面上存在最高点,等高线呈椭圆形,血红素肽铁得率随絮凝 pH 值(A)、絮凝温度(B)、离心转速(C)的增加呈现先升高后降低的趋势,说明在响应曲面上存在最大响应值,模型建立良好;通过响应面图,可以清楚地看出影响因素对血红素肽铁得率的影响,其中,曲线越陡峭,影响就越显著;相反,曲线越平缓,影响就越小。结合拟合方程,交互作用 AC、BC 对血红素肽铁得率影响极显著,AB 对血红素肽铁得率影响显著,二次项  $A^2$ 、 $B^2$ 、 $C^2$  对得率影响均极显著。



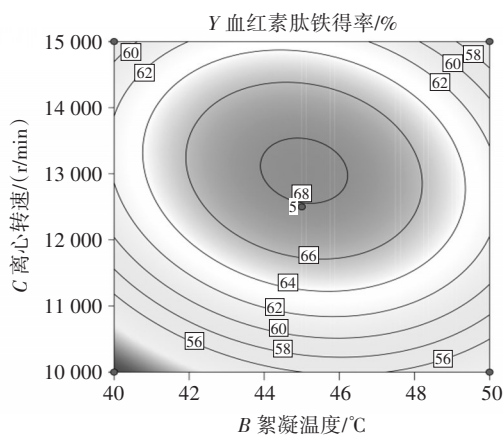
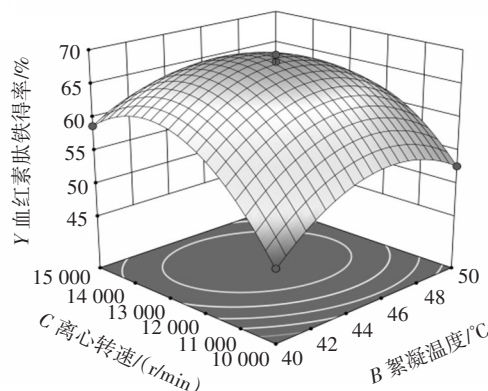


图7 各试验因素交互作用的响应面和等高线

Fig.7 Response surface and contour plots of interaction of experimental factors

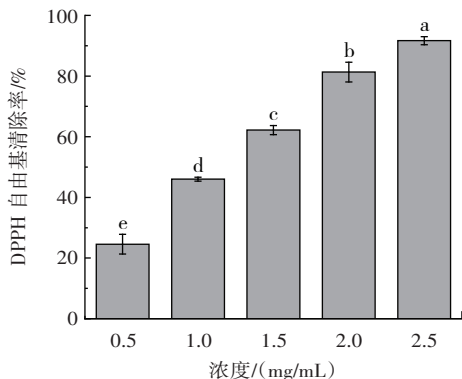


以血红素肽铁得率最大优化分析得到絮凝剂分离血红素肽铁的最佳工艺条件为絮凝 pH5.577、絮凝温度 43.935 °C、离心转速 13 151.5 r/min, 该条件下血红素肽铁得率的理论值达 69.455%。为验证模型的准确性, 考虑实际操作性, 将最优工艺条件调整为以 1.5% 壳聚糖作为絮凝剂、添加量 20%、絮凝 pH5.60、絮凝温度 44 °C、离心转速 13 100 r/min、离心时间 20 min, 进行验证性试验, 此条件下血红素肽铁得率为 (68.07±2.43)%, 纯度为 (30.57±2.34)%, 与模型理论值无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 说明该响应面模型及最优条件可靠性较高。

## 2.4 血红素肽铁体外抗氧化抗氧化活性

### 2.4.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是一种稳定自由基, 在波长为 517 nm 处有最大吸收, 当溶液中存在抗氧化剂时, DPPH 会与抗氧化剂反应, 未成对电子被转移给抗氧化剂, DPPH 自由基减少, 吸光度也随之降低, 通过测定吸光度的变化可以有效评估样品的抗氧化活性<sup>[28]</sup>。不同浓度血红素肽铁样品对 DPPH 自由基的清除能力如图 8 所示。



小写字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

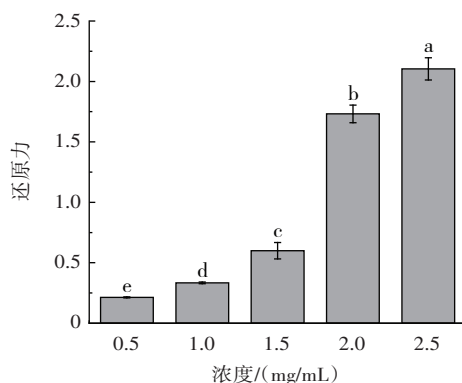
图8 不同浓度血红素肽铁对 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.8 Effect of different concentrations of heme peptide iron on DPPH free radical scavenging ability

由图 8 可知, 血红素肽铁样品浓度为 0.5~2.5 mg/mL 时, 随着样品浓度的增加, 样品的抗氧化活性呈上升的趋势, 当浓度达到 2.5 mg/mL 时, 样品的 DPPH 自由基清除率为 (91.66±1.34)%。样品 DPPH 自由基清除率的 IC<sub>50</sub> 值为 1.17 mg/mL, 说明血红素肽铁具有良好的抗氧化活性。

### 2.4.2 还原能力

不同浓度血红素肽铁样品对 Fe<sup>3+</sup> 的还原能力如图 9 所示, 在 700 nm 波长处的吸光度越大表明对 Fe<sup>3+</sup> 的还原能力越强。



小写字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图9 不同浓度血红素肽铁对 Fe<sup>3+</sup> 的还原能力的影响

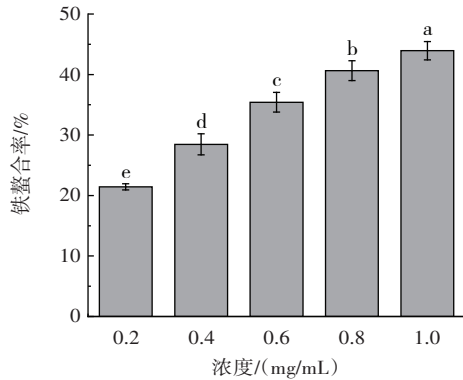
Fig.9 Effect of different concentrations of heme peptide iron on reducing ability of Fe<sup>3+</sup>

由图 9 可知, 血红素肽铁样品浓度为 0.5~2.5 mg/mL 时, 样品具有一定的还原能力, 随着样品浓度的增加, 吸光度不断增大, 表明其还原能力有显著提高, 当样品浓度为 2.5 mg/mL 时, 还原力为 2.10±0.09。

### 2.4.3 铁整合能力

亚铁离子是许多氧化反应的催化剂, 可通过反应产生自由基, 可能诱发心血管疾病, 具有整合亚铁离子活性的抗氧化物质可以限制铁离子的自由反应, 阻止

氧自由基的产生,从而保护细胞免受氧化损伤。不同浓度血红素肽铁样品的铁螯合能力如图10所示。



小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

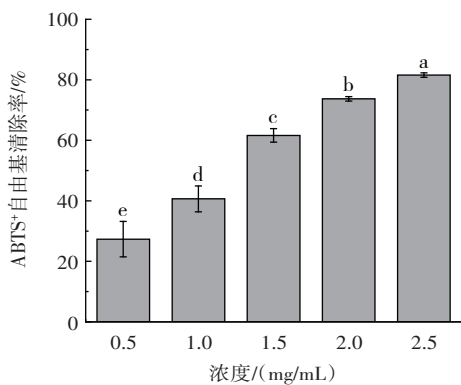
图10 不同浓度血红素肽铁对铁螯合能力的影响

Fig.10 Effect of different concentrations of heme peptide iron on iron chelation ability

由图10可知,血红素肽铁样品浓度为0.2~1.0 mg/mL时,随着样品浓度的增加,样品的铁螯合率显著提高,其中当样品浓度为1.0 mg/mL时,其铁螯合率达到(43.94±1.51)%。血红素肽铁对铁螯合能力的 $IC_{50}$ 值为1.16 mg/mL,说明其具有较好的抗氧化活性且效果较稳定。

#### 2.4.4 ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力

不同浓度血红素肽铁样品对ABTS<sup>+</sup>自由基的清除能力如图11所示。



小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图11 不同浓度血红素肽铁对ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力的影响

Fig.11 Effect of different concentrations of heme peptide iron on ABTS<sup>+</sup> free radical scavenging ability

由图11可知,血红素肽铁样品浓度为0.5~2.5 mg/mL时,随着样品浓度的增加,样品的ABTS<sup>+</sup>自由基清除率显著提高,其中当样品浓度为2.5 mg/mL时,其ABTS<sup>+</sup>自由基清除率达到(81.54±0.73)%。血红素肽铁的 $IC_{50}$ 值为1.25 mg/mL,说明样品具有较好的抗氧化活性。

### 3 结论

本研究结果表明,最优的血红素肽铁絮凝分离提取工艺条件:质量浓度为1.5%的壳聚糖溶液,添加量为20%,絮凝pH5.60,絮凝温度44℃,离心转速13 100 r/min,沉淀经真空冷冻干燥后得到产品,最终血红素肽铁得率达(68.07±2.43)%,纯度达(30.57±2.34)%。对得到的产品进行体外抗氧化活性研究,结果表明血红素肽铁样品的DPPH自由基清除能力 $IC_{50}$ 值为1.17 mg/mL,ABTS<sup>+</sup>自由基清除能力 $IC_{50}$ 值为1.25 mg/mL,铁螯合能力 $IC_{50}$ 值为1.16 mg/mL,具有一定抗氧化活性较且较稳定,该产品可作为一种抗氧化剂或补铁剂添加到食品中。本研究可以为絮凝剂在猪血分离领域的应用提供一定数据参考,为猪血资源开发提供有效途径,降低猪血分离成本,减少环境污染。

### 参考文献:

- [1] SORAPUKDEE S, NARUNATSOPANON S. Comparative study on compositions and functional properties of porcine, chicken and duck blood[J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2017, 37(2): 228-241.
- [2] 王丽媛,高艳蕾,张丽,等. 畜禽副产物的加工利用现状及研究展望[J]. 食品科技, 2022, 47(6): 174-183.  
WANG Liyuan, GAO Yanlei, ZHANG Li, et al. Processing and utilization status and research prospect of livestock and poultry by-products[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(6): 174-183.
- [3] LIU P X, WANG S W, ZHANG H, et al. Influence of glycosylated nitrosohaemoglobin prepared from porcine blood cell on physicochemical properties, microbial growth and flavour formation of Harbin dry sausages[J]. Meat Science, 2019, 148: 96-104.
- [4] SHINODA S, AZUMA Y. Heme iron absorption and gene expression of proteins related to heme iron absorption in rat small intestine[J]. Annals of Nutrition & Metabolism, 2017, 71: 431.
- [5] 郭鉴,刘栓,印遇龙,等. 动物源富铁功能食品开发研究进展[J]. 中国农学通报, 2021, 37(35): 98-103.  
GUO Liu, LIU Shuan, YIN Yulong, et al. Advances in development of animal-derived iron-rich functional food[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, 37(35): 98-103.
- [6] BERENDES L S, WESTHOFF P S, WITKOWSKI H, et al. Clinical and molecular analysis of a novel variant in heme oxygenase-1 deficiency: Unraveling its role in inflammation, heme metabolism, and pulmonary phenotype[J]. Molecular Genetics and Metabolism Reports, 2024, 38: 101038.
- [7] 郭晓东,王永刚,李志忠. 酶解牦牛血红蛋白生产氯化血红素工艺探究[J]. 中国食品工业, 2022(10): 106-109.  
GUO Xiaodong, WANG Yonggang, LI Zhizhong. Study on the technology of producing heme by enzymatic hydrolysis of yak hemoglobin[J]. China Food Industry, 2022(10): 106-109.
- [8] 胡睿琦,王建敏,王楠,等. 冰醋酸法提取猪血红素的研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(16): 5211-5213.  
HU Ruiqi, WANG Jianmin, WANG Nan, et al. Study on the extraction of hemoglobin from porcine blood by acetic acid method[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(16): 5211-5213.
- [9] VISSA M, SOUPENE E, LARKIN S K, et al. Differential acetone extraction of total and hemoprotein-unbound heme to quantify heme binding capacity of plasma in patients with sickle cell dis-



- ease: The role of heme scavengers[J]. Blood, 2020, 136(Supple 1): 15.
- [10] 王磊, 孙月, 胡宇, 等. 用于分离血红素的磁性壳聚糖复合材料的制备及表征[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(11): 92-98.  
WANG Lei, SUN Yue, HU Yu, et al. Preparation and characterization of magnetic chitosan composites for separating of human heme[J]. China Food Additives, 2022, 33(11): 92-98.
- [11] 代文婷, 陶永霞, 杨海燕, 等. 超声波结合 CMC-Na 对马血中血红素提取工艺效果影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(13): 257-261.  
DAI Wenting, TAO Yongxia, YANG Haiyan, et al. The impact of ultrasound combined with CMC-Na on the extraction of heme from horse blood[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(13): 257-261.
- [12] 韩晴, 王维婷, 杜鹏飞, 等. 畜禽血液中血红素的提取、检测及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(16): 28-34.  
HAN Qing, WANG Weiting, DU Pengfei, et al. Extraction, detection and application of heme in livestock and poultry blood[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2023(16): 28-34.
- [13] 杨锡洪, 夏文水. 酶法水解血红蛋白制备亚铁血红素肽[J]. 食品与机械, 2005, 21(3): 14-16, 40.  
YANG Xihong, XIA Wenshui. Preparation of ferrous heme - enriched peptide by enzymatic hydrolysis of hemoglobin[J]. Food and Machinery, 2005, 21(3): 14-16, 40.
- [14] 庄红, 朱媛媛, 张婷, 等. 亚铁血红素的酶法制备及其保护工艺[J]. 吉林大学学报(工学版), 2011, 41(3): 869-875.  
ZHUANG Hong, ZHU Yuanyuan, ZHANG Ting, et al. Enzymatic preparation and protection technology of heme[J]. Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition), 2011, 41(3): 869-875.
- [15] LI Q Q, GONG Y X, DU T, et al. Modified halloysite nanotubes as GRAS nanocarrier for intelligent monitoring and food preservation[J]. Food Chemistry, 2024, 444: 138678.
- [16] ALIZADEH H, LEON V F, ARINAITWE E, et al. A role of chain flexibility of polyacrylamide - based flocculants in flocculation of fine quartz[J]. Journal of Water Process Engineering, 2024, 58: 104867.
- [17] JIN W X, NAN J, CHEN M, et al. Superior performance of novel chitosan - based flocculants in decolorization of anionic dyes: Responses of flocculation performance to flocculant molecular structures and hydrophobicity and flocculation mechanism[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 452: 131273.
- [18] LIANG C, QI P X, GARCIA R A, et al. Molecular basis for the performance and mechanisms of methylated decolorized bovine hemoglobin flocculants[J]. Separation and Purification Technology, 2022, 292: 121017.
- [19] ZHAO Q F, WU H X, SHEN W, et al. Dielectric barrier discharge plasma - modified chitosan flocculant and its flocculation performance[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 251: 126364.
- [20] BADAWI A K, SALAMA R S, MOSTAFA M M M. Natural-based coagulants/flocculants as sustainable market-valued products for industrial wastewater treatment: A review of recent developments[J]. RSC Advances, 2023, 13(28): 19335-19355.
- [21] 吴毅刚, 王涵. 微生物絮凝剂的研究及应用现状[J]. 煤炭加工与综合利用, 2023(8): 20-25.  
WU Yigang, WANG Han. Research and application status of microbial flocculation[J]. Coal Processing & Comprehensive Utilization, 2023(8): 20-25.
- [22] 李政伟, 张金良, 蔡明, 等. 微生物絮凝剂在生活污水处理中的应用进展[J]. 水处理技术, 2023, 49(2): 25-29, 34.  
LI Zhengwei, ZHANG Jinliang, CAI Ming, et al. Review on microbial flocculant in domestic sewage treatment[J]. Technology of Water Treatment, 2023, 49(2): 25-29, 34.
- [23] HADIYANTO H, WIDAYAT W, CHRISTWARDANA M, et al. The flocculation process of *Chlorella* sp. using chitosan as a bio-flocculant: Optimization of operating conditions by response surface methodology[J]. Current Research in Green and Sustainable Chemistry, 2022, 5: 100291.
- [24] ZHENG S M, ZHOU Q X, CHEN C H, et al. Role of extracellular polymeric substances on the behavior and toxicity of silver nanoparticles and ions to green algae *Chlorella vulgaris*[J]. The Science of the Total Environment, 2019, 660: 1182-1190.
- [25] HYRYCZ M, OCHOWIAK M, KRUPIŃSKA A, et al. A review of flocculants as an efficient method for increasing the efficiency of municipal sludge dewatering: Mechanisms, performances, influencing factors and perspectives[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 820: 153328.
- [26] 丁淑芳, 潘凤娇, 赵玉洁, 等. 阳离子型淀粉接枝改性絮凝剂的合成及性能研究[J]. 中国煤炭, 2023, 49(9): 104-110.  
DING Shufang, PAN Fengjiao, ZHAO Yujie, et al. Research on the synthesis and performance of cationic starch graft-modified flocculant[J]. China Coal, 2023, 49(9): 104-110.
- [27] HALLER N, GREBLINGER A S, KULOZIK U. Separation of aggregated  $\beta$ -lactoglobulin with optimised yield in a decanter centrifuge[J]. International Dairy Journal, 2021, 114: 104918.
- [28] RUMPF J, BURGER R, SCHULZE M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123470.

加工编辑:王雪

收稿日期:2024-03-21